

DOI: 10.12264/JFSC2021-0135

花鲈 *ISG15* 基因 cDNA 序列的克隆及传染性脾肾坏死病毒胁迫下表达谱分析

刘勇^{1,2}, 闫路路², 文国樑², 范嗣刚², 张雅晴^{1,2}, 赵超², 王鹏飞², 邱丽华^{1,2,3}, 乔秀亭⁴

1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东省渔业生态环境重点实验室, 广东 广州 510300;
3. 农业农村部水生动物基因组学重点实验室, 北京 100141;
4. 天津农学院水产学院, 天津 300000

摘要: 为探究花鲈(*Lateolabrax maculatus*)干扰素刺激基因 15 (Interferon-stimulated gene 15, *ISG15*)在抵抗病毒过程的免疫应答反应, 本研究克隆、鉴定了花鲈 *ISG15* 基因(*LmISG15*), 并对其进行生物信息学分析, 获得了 *LmISG15* 在各组织中的表达特征及其在受到传染性脾肾坏死病毒(infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)感染后的时空表达特征。结果显示, 该基因全长 1625 bp, ORF 为 480 bp, 编码 160 个氨基酸, 分子质量为 17.5 kD, 理论等电点为 9.41。LmISG15 的氨基酸序列较为保守, 与眼斑拟石首鱼(*Sciaenops ocellatus*)和条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)相似度分别为 74.07%和 71.88%。*LmISG15* 在花鲈 10 种组织中均有表达, 在心脏中表达量最高, 其次在脑、中肾和鳃中的表达量较高, 在肌肉中表达量最低。注射 ISKNV 后, 花鲈头肾组织中病毒拷贝数升高, 同时 *LmISG15* 在花鲈肝脏、头肾和鳃中的表达量显著上调($P<0.05$)。研究表明, *LmISG15* 参与了抵抗病毒刺激的免疫应答过程。

关键词: 花鲈; *ISG15*; 克隆表达; ISKNV; 干扰素

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)11-1447-10

干扰素(interferon, IFN)是一个多基因家族的诱导性细胞因子, 具有抗病毒活性, 在脊椎动物抵御病毒感染方面发挥重要作用^[1-2]。当细胞受到病毒感染后, 细胞分泌干扰素, 干扰素与附近未感染的细胞膜上的干扰素受体结合, 激活酪氨酸 JAK-STAT 信号通路^[3]。这一信号的传导激活下游 300 多个干扰素刺激基因^[4](interferon-stimulated genes, ISGs)。其中, ISG15 蛋白能被快速而强烈地诱导出来, 从而引起了研究者的关注。

ISG15 是泛素(ubiquitin)基因家族的一员, 在肿瘤细胞中首次检测出来^[5]。研究表明, *ISG15* 及其修饰系统在先天免疫应答、干扰素信号传导调节、妊娠和多种癌症中起重要作用^[6]。*ISG15* 基因组序列有 2 个外显子和 1 个内含子^[7]。*ISG15* 的前体蛋白有 17 kD, 随后通过酶切反应, 去除了 8 个 C 端氨基酸, 使得 C 末端的 LRGG 基序能露出来^[8], 该基序为泛素或类泛素修饰蛋白结合靶蛋白的核心序列, *ISG15* 通过 LRGG 与靶蛋白结合

收稿日期: 2021-04-14; 修订日期: 2021-04-20.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31802281); 广州市珠江科技新星计划项目(201906010028); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2020TD21); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(中国水产科学研究院南海水产研究所)(2021SD11).

作者简介: 刘勇(1996-), 男, 硕士研究生, 从事鱼类免疫研究. E-mail: 747048135@qq.com

通信作者: 邱丽华(1971-), 女, 博士, 研究员, 从事水产生物技术研究. E-mail: qiugroup_bio@outlook.com

并进行共价修饰的过程被称为 ISG 化(ISGylation)。除了 LRGG 基序外, ISG15 蛋白还包含两个泛素样(ubiquitin-like, UBL)结构域^[4]。两个 UBL 结构域通过一个短铰链区链接组成, 通过共价结合到细胞或病毒上的蛋白^[9]。未参与共价结合的 ISG15 蛋白能够以细胞因子单体形式分布于细胞内外, 促进自然杀伤性细胞和树突状细胞增殖, 增强中性粒细胞的趋化活性^[10]。

目前, *ISG15* 已经在许多硬骨鱼类中被克隆, 包括斑马鱼(*Danio rerio*)^[11]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[12]、大西洋鳕(*Gadus morhua*)^[13]、鲫(*Carrasius auratus*)^[14]、许氏平鲷(*Sebastes schlegeli*)^[15]、眼斑拟石首鱼(*S. ocellatus*)^[16]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[17]、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[18]、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[19]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[20]、欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[21]、塞内加尔鳎(*Solea senegalensis*)^[7]、金头鲷(*Sparus aurata*)^[4]和大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[22]。研究表明, 在硬骨鱼类中 *ISG15* 可以被 IFN- I、poly(I:C)^[20,23]、病毒^[20]、脂多糖^[18]和细菌^[16]或其他病原体相关分子诱导。在体外实验中, *ISG15* 蛋白对几种鱼类病毒如石斑鱼神经坏死病毒(grouper nervous necrosis virus, GNNV)^[19]、传染性造血器官坏死病毒(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)、病毒性出血性败血病病毒(viral haemorrhagic septicaemia virus, VHSV)、传染性胰腺坏死病毒(infectious pancreas necrosis virus, IPNV)和流行性造血性坏死病毒(epizootic hematopoietic necrosis virus, EHNV)^[19]表现出抗病毒活性, 同时发现通过 RNAi 干扰 *ISG15* 表达后可导致半滑舌鳎淋巴细胞更易受到肿大细胞病毒(*Megalocytivirus*)感染^[18]。这些结果表明硬骨鱼类 *ISG15* 在天然抗病毒免疫中可能起重要作用。

花鲈(*Lateolabrax maculatus*), 又称海鲈, 具有生长快、肉质鲜美和经济效益高等特点, 在我国海水养殖鱼类中占有重要地位^[24]。随着花鲈市场的不断扩大, 花鲈养殖密度的不断提高, 但由于科学养殖技术水平有限, 花鲈病害发生频繁, 尤其在病毒性疾病方面更是日趋严重^[25]。ISKNV 为肿大细胞病毒属(*Megalocytivirus*)的代表种, 可

感染鲈形目(Perciformes)、鲷形目(Pleuronectiformes)、鲱形目(Clupeiformes)、鲑形目(Tetraodontiformes)、灯笼鱼目(Myctophiformes)和鲻形目(Mugiliformes)中的 50 余种鱼类^[26], 引起鱼类死亡。据报道, 感染 ISKNV 的野生和人工养殖尖吻鲈(*Lates calcarifer*)的死亡率分别为 85.89% 和 83.30%, 对死亡的尖吻鲈进行解剖观察发现其脾脏肿大^[27], 通过组织病理学切片观察到肾脏和肝脏中有大量异常增大的细胞^[28]。

在花鲈中, *LmISG15* 在外界病原刺激下的抗病毒感染作用尚未见相关报道, 其分子响应机制尚不清楚。本研究克隆并鉴定 *LmISG15*, 用实时荧光定量(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)探究 *LmISG15* 的组织表达及其在病毒刺激下的表达情况, 旨在为 *LmISG15* 的抗病毒免疫反应提供分子生物学基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

从广州市华润万家超市购买 3 尾健康花鲈(体重约 300 g)。在实验室暂养 3 d 后, 麻醉后解剖取其心脏、肝脏、头肾、中肾、鳃、胃、脾脏、脑、肠和肌肉组织, 将组织样品立即放入液氮冷冻保存, 用于 *LmISG15* 序列克隆和组织分析表达。

在中国水产科学研究院南海水产研究所珠海基地进行攻毒实验。从珠海基地池塘捕捞 180 尾花鲈, 体重约(20±5) g。实验前在水泥池中暂养 7 d, 海水盐度为 2.88, 温度为(25±1) °C, 每天换 1/3 水, 及时清除池内的残留物, 并投喂饲料。

1.2 病毒刺激实验

从水泥池中选取 160 尾健康花鲈, 平均分到 10 个养殖水槽(水体 0.5 m³)中, 实验组和对照组各设置 5 个养殖水槽, 作为 5 组生物学平行。实验开始时, 向实验组花鲈腹腔注射 ISKNV 病毒(由中国水产科学研究院珠江水产研究所馈赠), 每尾注射 100 μL (病毒浓度为 2.9×10² copy/μL); 向对照组花鲈腹腔注射磷酸缓冲液 (PBS), 每尾注射 100 μL。注射后, 分别在 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h 和 5 d 时取样。在每个取样时间点, 实验组和对照组各取 5 尾花鲈(每个水槽中取

1 尾)进行麻醉,快速取花鲈头肾、肝脏、脾脏和鳃组织,速冻至液氮中,后转移至-80℃冰箱中长期保存,备用。

1.3 DNA、RNA 提取和 cDNA 合成

用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(中国,天根)提取头肾组织的 DNA,用于检测头肾组织中病毒拷贝数。使用 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, 美国)检测 DNA 的纯度和浓度,使用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。将已提取的 DNA 用 ddH₂O 稀释至统一浓度后保存至 -20℃冰箱备用。

用 Trizol 试剂(Invitrogen, 美国)进行 RNA 样品的提取,具体操作参照说明书进行,使用 NanoDrop2000 (Thermo Scientific, 美国)超微量分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度,使用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。将提取好的 RNA 按照 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, 日本)的操作说明书进行反转录合成 cDNA,保存至-20℃冰箱备用。

1.4 *LmISG15* cDNA 序列的克隆

从花鲈转录组数据库中获取 *LmISG15* 序列,设计 *LmISG15* 相关引物和 *Lmβ-actin* 基因引物。花鲈头肾、肝和脑等组织的 cDNA 等量混合作为模板,以引物 ISG15F/R 进行 PCR 扩增反应。程序设定为 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 48℃退火 30 s, 72℃延伸 60 s, 进行 30 个循环; 最后 72℃延伸 7 min, 4℃保存。PCR 反应结束后将 PCR 反应产物连接到 PMD18-T 载体中、转化入

大肠杆菌 DH5α 的感受态细胞,送到广州擎科生物公司(中国,广州)测序。

1.5 序列和系统发育分析

利用 ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)查找 *LmISG15* 序列的开放阅读框; 使用生物信息学网络工具(<http://emboss.bioinformatics.nl/>)预测氨基酸序列; 使用 SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?GENOMIC=1)预测蛋白结构域和功能域; 使用 ExPaSy 计算(http://web.expasy.org/compute_pi/)理论等电点和分子量。其他物种的 ISG15 氨基酸序列从 NCBI 的 GenBank 数据库下载并用 Clustal X 和 Bioedit 软件进行比对; 进化树用 MEGA-X 的邻接法(neighbor-joining, NJ)进行构建。

1.6 绝对定量标准质粒构建

取 ISKNV 病毒阳性 DNA 模板,用 Lm-ISKNV-F/R 引物扩增 ISKNV 病毒的主要衣壳蛋白基因 (*MCP*) (表 1), 对目的基因进行胶回收, 连接至 PMD18-T 载体上, 然后将连接产物转化至 DH5α 大肠杆菌细胞中, 挑取单菌落并进行菌液 PCR 验证, 将阳性克隆送至生物公司进行 Sanger 测序, 并将测序结果与 NCBI 数据库中 *MCP* 序列进行比对。

1.7 实时荧光定量 PCR

使用 Light Cycler 480 荧光定量 PCR 仪进行 *MCP* 基因的绝对定量和 *LmISG15* 基因的相对定量。为确保实验数据准确可靠, 每一组实验均进行两轮测定。

表 1 实验所用引物
Tab. 1 Sequences of primers used in this study

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 purpose	退火温度/℃ annealing temperature
ISG15-F	ATGGATCTAATCGTCGTCATG	序列验证	48
ISG15-R	TCAGCTCCTCTCAGACGGAG	序列验证	48
ISG15-q2-F	ACGGCCATAAAACACCCCTC	qPCR	60
ISG15-q2-R	GGTTTCTGAGGAACACCTGGA	qPCR	60
qLmβ-actin-F	CAACTGGGATGACATGGAGAAG	内参基因	60
qLmβ-actin-R	TTGGCTTTGGGGTTCAGG	内参基因	60
Lm-ISKNV-F	CGTGAGACCGTGC GTAGT	构建标准质粒	58
Lm-ISKNV-R	AGGGTGACAGTCGATATG	构建标准质粒	58
Lm-ISKNV-qF	CGCCGCCTACCTTAATTTGC	检测病毒拷贝数	60
Lm-ISKNV-qR	ATTGTACGGCAGAGACACGG	检测病毒拷贝数	60

绝对定量中, 根据公式: 质粒拷贝数 $= (6.02 \times 10^{23} \times \text{质粒浓度} \times 10^{-9}) / \text{重组质粒分子量}^{[29]}$, 计算质粒拷贝数, 按照终浓度为 $5^1 \text{ copy}/\mu\text{L}$ 、 $5^2 \text{ copy}/\mu\text{L}$ 、 $5^3 \text{ copy}/\mu\text{L}$ 、 $5^4 \text{ copy}/\mu\text{L}$ 、 $5^5 \text{ copy}/\mu\text{L}$ 分别进行稀释, 每个浓度梯度设置 3 个重复。将稀释后的各梯度重组质粒作为标准品模板, 进行 real-time PCR 扩增。

相对定量中, 以 *Lm β -actin* 为内参基因(表 1), 采用 qRT-PCR 技术检测 *LmISG15* 在花鲈不同组织中的相对表达量, 同时检测花鲈经过 ISKNV 感染刺激后头肾、脾脏、肝脏和鳃 4 个免疫组织中 *LmISG15* 的时空表达特征。每轮实验均设置 5 个生物学平行和 3 个技术重复。

采用 TB Green™ Premix Ex Taq™ (TaKaRa, 日本)试剂盒进行实时荧光定量 PCR。反应体系为: 12.5 μL , 其中 cDNA 模板 2 μL , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , TB Green Premix Ex Taq II 6.25 μL , ddH₂O 3.25 μL 。采用两步法进行扩增, 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$

退火 30 s, 共 40 个循环。反应结束后, 对 PCR 产物进行熔解曲线检测, 确保扩增产物为单峰。

1.8 数据分析

绝对定量采用二阶导数法进行数据分析, 相对定量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。所有实验得出的数据采用 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 利用 GraphPad Prism 8 对统计结果进行作图, 差异显著性设为 $P < 0.05$, 差异极显著设为 $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 *LmISG15* 的克隆及序列分析

LmISG15 的 ORF 为 480 bp, 可以编码 159 个氨基酸, 预测相对分子质量为 17.5 kD, 理论等电点为 9.41。利用 SMART 在线软件预测 *LmISG15* 蛋白结构域, 结果显示 *LmISG15* 氨基酸序列含有 2 个 UBL 结构域, 分别位于 1~76 和 85~155 位置, 其 C 端结构域和泛素蛋白一样具有 LRGG 基序 (图 1)。

```

1-7  TATATAAAGTGTGGTGAGCTGAAACCTCTGACACAGCTGCTCACCATCATTTGTTTACGTGCACCGACTCAAGA
76-150 CTTTACAACAAGTTTTCCTGAGGAGTTTGTCAAGTGATCACAAGGCCACTTTGATCATGATCTAATCGTCGTC
1-6                                     M D L I V V
151-225 ATGCTGAATGGGACGTCCACACCCTGAGGGTGAACCAACAGGACACAGTGGGCTCTCTGAAAAAAGTCAATCCAG
7-31  M L N G T S H T L R V N Q Q D T V G S L K K L I Q
226-300 GACAACTAGGAGTCCCTCTGAGAGGCAGAGCTGGTCTTTGTTAACGGCCATAAAACCCCTCAACAACGAC
32-56  D K L G V P S E R Q K L V F V N G H K T P L N N D
301-375 TCGCAGTCTGTCAGCTCCTACGGCCTGCAGTCTGGCTCCAGGTGCTCTGCTGGTGACACAGCCGCGGCCAG
57-81  S Q S V S S Y G L Q S G S Q V S L L V T Q P P A Q
376-450 CCGGCCACCATCCAGGTGTTCTCAGAAACCTAAATGCCAGATGAGCACCTATGATATCAAACCTGACGAGACT
82-106 P A T I Q V F L R N L N G Q M S T Y D I K P D E T
451-525 GTGAGCAACTTCAAGACCAAGGTGGCGTGACAGAGGGGGTGAGGTGAGCCAGCAGAGACTCCTTACCAAAGC
107-131 V S N F K T K V A C R E G V E V S Q Q R L L H Q S
526-600 AGGAGATGACGACTGGTAGACTTTCAGACTACAACGTCGAGCCCTGAGCACCATCGACATGCTGCTCGTCTG
132-156 R E M T T G R L S D Y N V A A L S T I D M L L R L
601-675 AGAGGAGGCTGAGGACACTTCTGGTTAATATTTACTGTACATACTTATATTTAATAAATTAAGATCAAAGTGC
157-160 R G G *
676-750 CATATTTTCATGTTTATTTTATTTTGAATAATGAATACATTCCACCATGTGTAATTCTGGCATACCTTAATCGCTT
751-804 GTTTTTTGTAAATTTTGTATTTTGTATGTTACACACACACACACACA

```

图 1 花鲈 *LmISG15* cDNA 序列及其氨基酸编码序列

方框中的字母分别表示起始密码子(ATG)和终止密码子(TGA), 阴影区域代表 2 个类泛素化结构域序列特征。

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *LmISG15* in *Lateolabrax maculatus*. The letters in the box indicate the start codon (ATG) and the stop codon (TGA), respectively, and the shadow part represents sequence characteristics of two UBL (ubiquitin-like) domain.

2.2 LmISG15 多重序列比对和进化树分析

LmISG15 氨基酸序列经过 DNAMAN 软件比对分析发现, LmISG15 氨基酸序列较为保守, 与眼斑拟石首鱼的相似度最高, 为 74.07%; 其次是与条石鲷的相似度, 为 71.88%; 与斑马鱼相似度较低, 为 44.38%; 与人的相似度最低, 仅为 29.41%。

通过氨基酸序列多重比较, 在 LmISG15 的氨基酸序列上发现两个保守性较高的 UBL 结构域和部分鱼类具有的 LRGG 基序(图 2)。系统进化树显示, 花鲈首先与眼斑拟石首鱼和大黄鱼聚类为一支, 之后与鳊和条石鲷等硬骨鱼聚类为一支, 与哺乳类关系最远(图 3)。

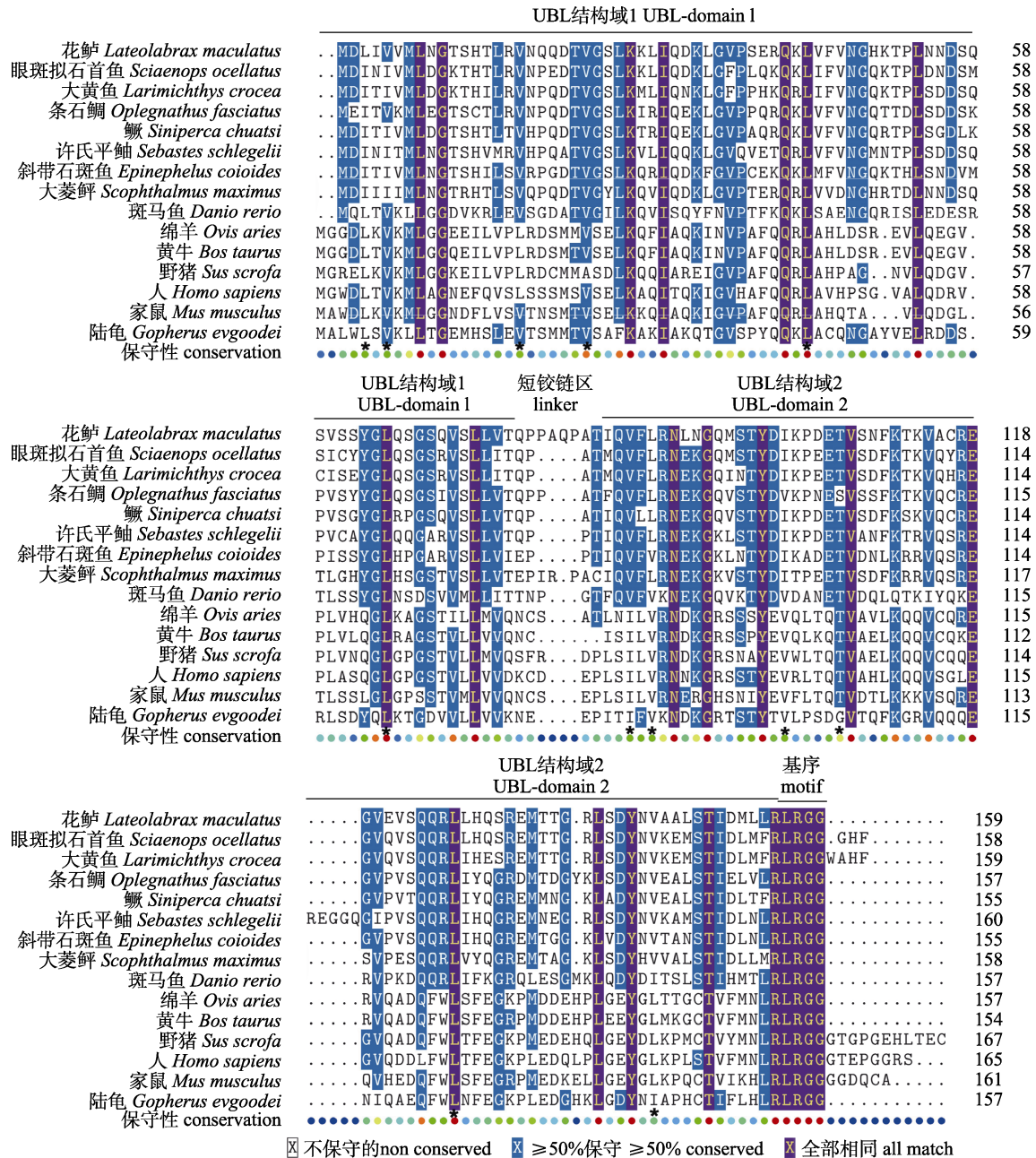


图 2 花鲈 LmISG15 氨基酸序列与其他物种 ISG15 氨基酸序列的比对结果

每个 UBL 域中的 6 个不变的脂肪族残基用星号标出, 物种登录号与进化树一致。

Fig. 2 Multiple alignment of the amino acid sequences of ISG15 in *Lateolabrax maculatus* and in other species. Six invariant aliphatic residues in each UBL domain are indicated by asterisks, and the species accession numbers are consistent with the phylogenetic tree.

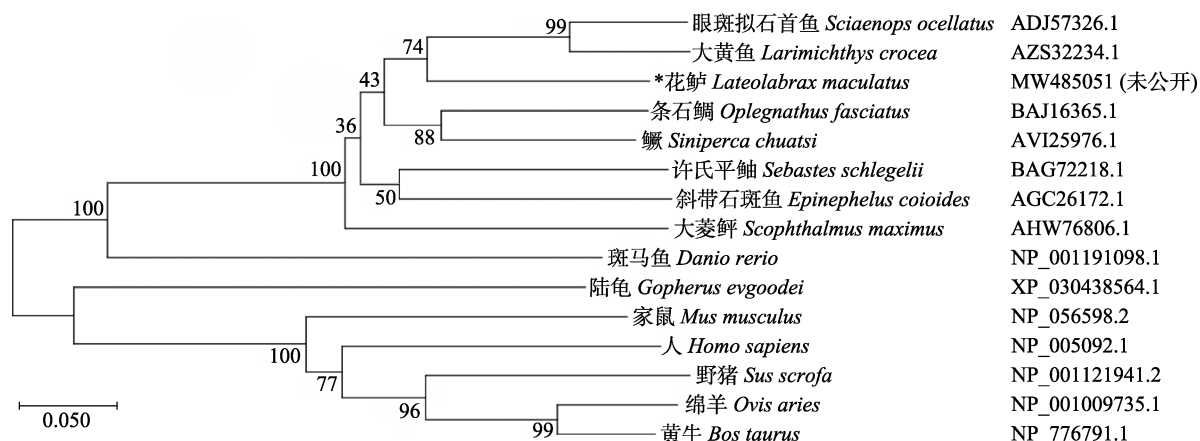
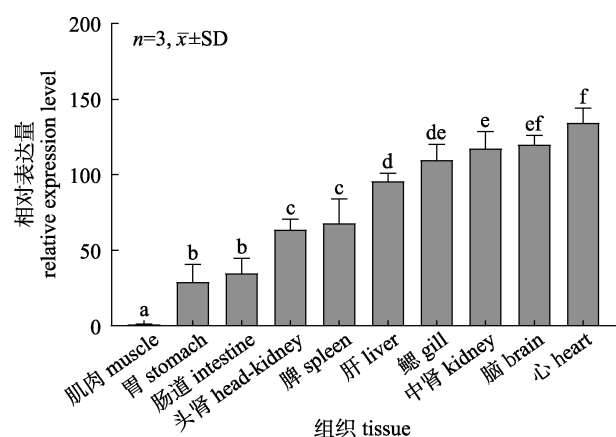


图 3 基于花鲈 LmISG15(*)氨基酸序列构建 NJ 进化树

Fig. 3 NJ phylogenetic tree based on the amino acid sequence of LmISG15 of *Lateolabrax crocea* (*)

2.3 *LmISG15* 组织分布的差异表达

为了探究 *LmISG15* 在花鲈不同组织中的表达模式, 利用 qRT-PCR 检测 *LmISG15* 在各组织中的表达情况。如图 4 所示, *LmISG15* 在心脏中表达量最高, 在脑、中肾和鳃中的表达量次之, 在肌肉中表达量最低。

图 4 *LmISG15* 在花鲈不同组织中的相对表达量
不同字母表示不同组织之间差异显著 ($P < 0.05$)。Fig. 4 Relative expressions of *LmISG15* transcripts in different tissues of *Lateolabrax maculatus*

Different letters denotes significant differences between different tissues ($P < 0.05$).

2.4 病毒拷贝数

通过检测花鲈头肾组织内 ISKNV 的拷贝数发现, 在注射病毒 12 h 后, 病毒的拷贝数从 0 增加至 1.4×10^3 copy, 在 48 h 时达到峰值, 为 2.8×10^4 copy/ μ L, 整体呈现先增加后下降的趋势 (图 5)。

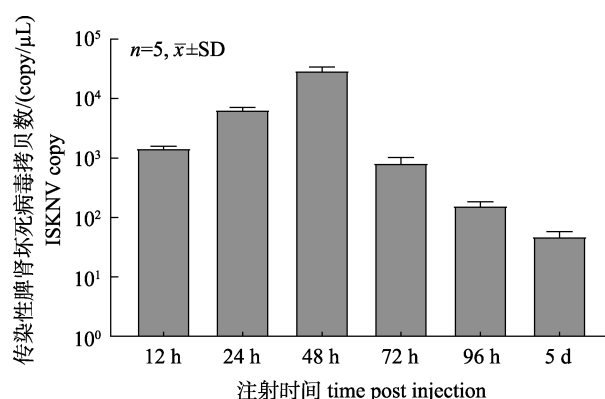


图 5 花鲈头肾组织内 ISKNV 刺激后拷贝数

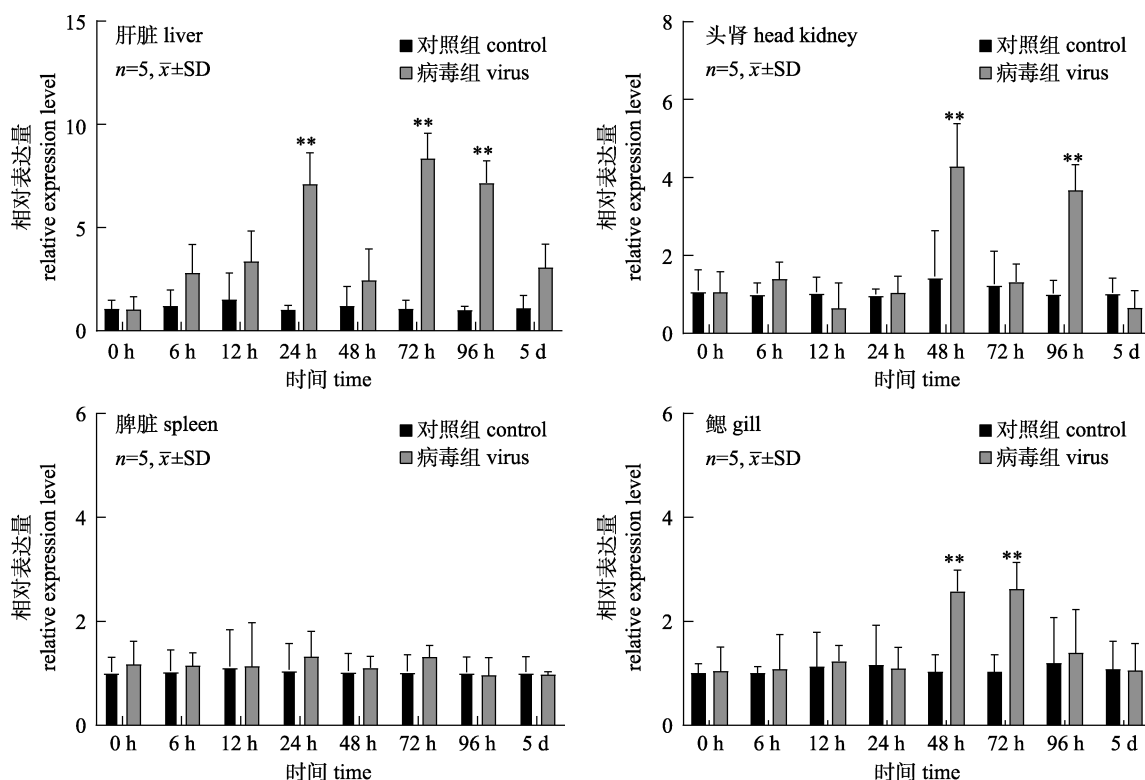
Fig. 5 Copies of ISKNV after challenge in *Lateolabrax maculatus*

2.5 *LmISG15* 在 ISKNV 刺激下的表达变化

与对照组相比, 花鲈肝脏、头肾和鳃 3 个组织中的 *LmISG15* 的表达均显著增加, 而 *LmISG15* 在脾脏中的表达没有显著增加 (图 6)。在肝脏中, *LmISG15* 的表达量逐渐上升并在 72 h 达到峰值 (为对照组的 7.86 倍); 在头肾中, *LmISG15* 的表达量在 48 h 达到峰值 (为对照组的 5.73 倍); 在鳃中, *LmISG15* 的表达量逐渐上升并在 72 h 达到峰值 (为对照组的 2.55 倍)。相同地, 3 个组织在达到峰值后逐渐恢复至正常水平。

3 讨论

本研究克隆得到了 *LmISG15* 序列, 并且分析了其表达和功能。利用在线结构域分析网站 SMART 分析发现 *LmISG15* 的氨基酸序列含有两个 UBL 结构域和一个 LRGG 基序, 通过氨基

图 6 ISKNV 刺激后 *LmISG15* 在花鲈肾、脾、肝和鳃中的相对表达量“*”，差异显著($P < 0.05$)；“**”，极显著差异($P < 0.01$)。Fig. 6 Relative expression levels of *LmISG15* in the head kidney, spleen, liver and gill of *Lateolabrax maculatus* after challenged with ISKNV“*”，significant difference at $P < 0.05$ ；“**”，highly significant difference at $P < 0.01$.

酸序列多重比较发现，硬骨鱼类 ISG15 的蛋白序列保守性高，其中 LRGG 基序通过类泛素化过程与靶蛋白偶联，并影响酶促降解、亚细胞定位和靶蛋白的半衰期^[30-31]，类泛素化在抗病毒活性和适当调节宿主抗病毒应答中均起着重要作用^[32]。

利用 qRT-PCR 测定花鲈不同组织中 *LmISG15* 的相对表达量，结果显示 *LmISG15* 在花鲈的不同组织中均有分布，而且在免疫组织中的表达量较高。其中，*LmISG15* 在花鲈心脏中表达量最高，在脑、中肾和鳃中的表达量依次降低，在肌肉中的表达量最低。花鲈与大黄鱼^[22]、半滑舌鳎^[18]和大菱鲆^[20]的表达模式相似，*ISG15* 在大黄鱼^[22]外周血、心脏、肝脏和鳃中表达量较高、在半滑舌鳎^[18]肠道、心脏、脑和脾脏中表达量较高、在大菱鲆^[20]脾脏、头肾和皮肤中表达量较高。以上结果说明 *ISG15* 主要分布于免疫组织中并参与机体的免疫应答，同时 *ISG15* 在不同硬骨鱼类的组织中表达量存在差异。据相关研究报道，*ISG15* 在鞍带石斑

鱼(*Epinephelus lanceolatus*)^[33]、大黄鱼^[22]和眼斑拟石首鱼^[16]的血液组织中的表达量最高，血液组织中含有许多免疫细胞，同时，在哺乳动物^[34]中，*ISG15* 蛋白已经被证明由外周血白细胞分泌，它们参与机体应对外界刺激时的免疫反应。心脏中 *LmISG15* 的表达量最高，推测因为心脏中白细胞的含量丰富^[4]，心脏作为重要的输血器官，为血液输送到全身各个器官提供了动力，让血液中的免疫细胞快速到达病毒感染部位并发挥相应作用。

花鲈注射 ISKNV 后，对其脾、肾、肝脏和鳃中的 *LmISG15* 的 mRNA 表达量和头肾组织的 ISKNV 的拷贝数进行测定发现，肝脏、头肾和鳃 3 个组织中 *LmISG15* 的 mRNA 表达量均有显著上调($P < 0.05$)，上调后逐渐恢复到最低水平，这与头肾组织内 ISKNV 的拷贝数呈现先增加后下降的趋势相同。其中，*LmISG15* 在 3 个免疫组织上调表达趋势与鞍带石斑鱼^[33]、塞内加尔鳎^[7]和大菱鲆^[20]免疫组织受到病毒感染后的上调趋势相

似, 鞍带石斑鱼^[33]的肾和脾在受到斑石鲷虹彩病毒(spotted knifejaw iridovirus, SKIV)感染后呈先上调后恢复到正常水平的趋势; 塞内加尔鲷^[7]在受到赤点石斑鱼神经坏死病(red-spotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV)和拟鲈神经坏死病毒(striped jack nervous necrosis virus, SJNNV)的感染后, 头肾中 *LmISG15* 的表达量呈先上调后恢复到正常水平的趋势; 大菱鲆^[20]受到大菱鲆红体虹彩病毒(turbot reddish body iridovirus, TRBIV)刺激后, 脾脏中 *ISG15* 的表达量也呈先上调后恢复到正常水平的趋势。相比较于到 poly(I:C)的刺激, 鱼类受到病毒刺激后, 组织中 *ISG15* 的表达会迟缓一些。在花鲈受到病毒刺激后, 头肾和鳃中 *LmISG15* 的表达量在 48 h 或 48 h 以后达到最高值, 但当欧洲鲈^[21]受到 poly(I:C)的刺激后, 肾和脑中 *ISG15* 的表达量在 8 h 达到最高值, 然后慢慢恢复到正常水平。这可能是因为 poly(I:C)直接激活了鱼类的免疫系统, 而向鱼体内注射病毒需要经历一系列复制和分裂的过程才能诱导细胞激活 *ISG15*。Shen 等^[22]发现, 在 poly(I:C)刺激后, 大黄鱼脾脏和肝脏中 *ISG15* 分别在 6 h 和 12 h 达到最高表达量, 这与 Shen 等^[35]先前研究的与信号通路有关的 *MDA5* 和 *MAVS* 基因相同, 推测 *ISG15* 的表达调节是由 RIG-1 样受体信号通路和 TLR3 的信号通路介导, 不过这还需要进一步实验证明。

本研究通过对 *LmISG15* 进行基因克隆、氨基酸序列分析、*LmISG15* 组织分布以及受病原刺激表达模式分析的探究, 初步表明, *LmISG15* 参与了花鲈对外界刺激的免疫应答过程。这为鱼类的先天免疫应答研究提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Robertsen B. The interferon system of teleost fish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(2): 172-191.
- [2] Samuel C E. Antiviral actions of interferons[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, 14(4): 778-809.
- [3] Zhou Z L, Hamming O J, Ank N, et al. Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(14): 7749-7758.
- [4] Álvarez-Torres D, Gómez-Abellán V, Arizcun M, et al. Identification of an interferon-stimulated gene, *isg15*, involved in host immune defense against viral infections in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 73: 220-227.
- [5] Perng Y C, Lenschow D J. ISG15 in antiviral immunity and beyond[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(7): 423-439.
- [6] Dao C T, Zhang D E. ISG15: a ubiquitin-like enigma[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2005, 10: 2701-2722.
- [7] Álvarez-Torres D, Podadera A M, Alonso M C, et al. Molecular characterization and expression analyses of the *Solea senegalensis* interferon-stimulated gene 15 (*isg15*) following NNV infections[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 66: 423-432.
- [8] Potter J L, Narasimhan J, Mende-Mueller L, et al. Precursor processing of pro-ISG15/UCRP, an interferon- β -induced ubiquitin-like protein[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(35): 25061-25068.
- [9] Zhang D X, Zhang D E. Interferon-stimulated gene 15 and the protein ISGylation system[J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2011, 31(1): 119-130.
- [10] Wang G L, Huan H R, Li Y J, et al. Progress on antiviral immunity of interferon-stimulated gene 15[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2020, 41(7): 111-114. [王改丽, 呼延含蓉, 李昱洁, 等. 干扰素刺激基因 15 抗病毒免疫研究进展[J]. *动物医学进展*, 2020, 41(7): 111-114.]
- [11] Altmann S M, Mellon M T, Distel D L, et al. Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish, *Danio rerio*[J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(6): 3890.
- [12] Røkenes T P, Larsen R, Robertsen B. Atlantic salmon ISG15: Expression and conjugation to cellular proteins in response to interferon, double-stranded RNA and virus infections[J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(5): 950-959.
- [13] Seppola M, Stenvik J, Steiro K, et al. Sequence and expression analysis of an interferon stimulated gene (ISG15) from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2007, 31(2): 156-171.
- [14] Zhang Y B, Wang Y L, Gui J F. Identification and characterization of two homologues of interferon-stimulated gene ISG15 in crucian carp[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(1): 52-61.
- [15] Baek G W, Kim J W, Park C I. Identification and expression analysis of an interferon stimulated gene 15 (ISG15) from black rockfish, *Sebastes schlegelii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(5): 679-681.
- [16] Liu C S, Sun Y, Zhang M, et al. Identification and analysis of a *Sciaenops ocellatus* ISG15 homologue that is involved

- in host immune defense against bacterial infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(1): 167-174.
- [17] Yasuike M, Kondo H, Hirono I, et al. Identification and characterization of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* interferon-stimulated gene 15 (If-ISG15)[J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2011, 34(1): 83-91.
- [18] Wang W, Zhang M, Xiao Z Z, et al. *Cynoglossus semilaevis* ISG15: A secreted cytokine-like protein that stimulates antiviral immune response in a LRGG motif-dependent manner[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(9): e44884.
- [19] Huang X H, Huang Y H, Cai J, et al. Molecular cloning, expression and functional analysis of ISG15 in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(5): 1094-1102.
- [20] Lin J Y, Hu G B, Liu D H, et al. Molecular cloning and expression analysis of interferon stimulated gene 15 (ISG15) in turbot, *Scophthalmus maximus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 895-900.
- [21] Moreno P, Garcia-Rosado E, Borrego J J, et al. Genetic characterization and transcription analyses of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) isg15 gene[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 55: 642-646.
- [22] Shen B, Wei K, Guo S Y, et al. Molecular characterization and expression analyses of two homologues of interferon-stimulated gene ISG15 in *Larimichthys crocea* (Family: Sciaenidae)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 846-857.
- [23] Langevin C, van der Aa L M, Houel A, et al. Zebrafish ISG15 exerts a strong antiviral activity against RNA and DNA viruses and regulates the interferon response[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(18): 10025-10036.
- [24] Hu Y B, Li Y, Wen H S, et al. Characterization of thermal tolerance of juvenile *Lateolabrax maculatus* from different communities[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2019, 49(S2): 1-7. [胡彦波, 李昀, 温海深, 等. 不同群体花鲈幼鱼温度耐受特征的初步研究[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2019, 49(S2): 1-7.]
- [25] Zhang T, Wang C Y, Meng X S. The mass inoculation method in Japanese perch (*Lateolabrax japonicus*) juveniles[J]. *Fisheries Science*, 2007, 26(9): 512-514. [张涛, 王常玉, 孟雪松. 大批量注射花鲈疫苗方法的研究[J]. *水产科学*, 2007, 26(9): 512-514.]
- [26] Wang Y Q, Lü L, Weng S P, et al. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of a marine fish infectious spleen and kidney necrosis virus-like (ISKNV-like) virus[J]. *Archives of Virology*, 2007, 152(4): 763-773.
- [27] Thanasaksiri K, Fukuda K, Hanggono B, et al. Isolation of infectious spleen and kidney necrosis virus from farmed Asian seabass in Indonesia and effect of fish size on its virulence[J]. *Aquaculture Research*, 2021, 52(1): 415-418.
- [28] Zhu Z M, Duan C, Li Y, et al. Pathogenicity and histopathology of infectious spleen and kidney necrosis virus genotype II (ISKNV-II) recovering from mass mortality of farmed Asian seabass, *Lates calcarifer*, in Southern China[J]. *Aquaculture*, 2021, 534: 736326.
- [29] Peng C. Studies on pathogenicity of *Ranavirus* GIV-R-SY1301 to *Epinephelus lanceolatus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015. [彭超. 蛙病毒 GIV-R-SY1301 株对鞍带石斑鱼致病性的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.]
- [30] Morales D J, Lenschow D J. The antiviral activities of ISG15[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2013, 425(24): 4995-5008.
- [31] Campbell J A, Lenschow D J. Emerging roles for immunomodulatory functions of free ISG15[J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2013, 33(12): 728-738.
- [32] Durfee L A, Lyon N, Seo K, et al. The ISG15 conjugation system broadly targets newly synthesized proteins: Implications for the antiviral function of ISG15[J]. *Molecular Cell*, 2010, 38(5): 722-732.
- [33] Ma T, Wang L, Zhao Y Z, et al. Molecular characterization and expression analyses of the viral infection of the interferon-stimulated gene 15 (isg15) in *Epinephelus lanceolatus*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(5): 31-39. [马腾, 王磊, 赵玉柱, 等. 鞍带石斑鱼 isg15 基因 cDNA 克隆及其在虹彩病毒感染下的表达分析[J]. *渔业科学进展*, 2021, 42(5): 31-39.]
- [34] D'Cunha J, Knight E, Haas A L, et al. Immunoregulatory properties of ISG15, an interferon-induced cytokine[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(1): 211-215.
- [35] Shen B, Hu Y W, Zhang S Y, et al. Molecular characterization and expression analyses of three RIG-I-like receptor signaling pathway genes (MDA5, LGP2 and MAVS) in *Larimichthys crocea*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 55: 535-549.

cDNA cloning and expression profile analysis of *ISG15* in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) following infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) infection

LIU Yong^{1,2}, YAN Lulu², WEN Guoliang², FAN Sigang², ZHANG Yaqing^{1,2}, ZHAO Chao², WANG Pengfei², QIU Lihua^{1,2,3}, QIAO Xiuting⁴

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment, Guangzhou 510300, China;

3. Key Laboratory of Aquatic Genomics, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100141, China;

4. Fisheries College, Tianjing Agricultural University, Tianjing 300000, China

Abstract: Sea bass (*Lateolabrax maculatus*) is an important mariculture fish and is widely cultured along the coast of China. As the culture of *L. maculatus* continue to increase in terms of scale and density, so will the potential occurrence of viral diseases. Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), a species of the genus *Megalocytivirus*, causes a serious systemic disease with high morbidity and mortality in both freshwater and marine fishes. Therefore, it is crucial to verify the immune mechanism of *L. maculatus* against ISKNV. Interferon-stimulated gene 15 (*ISG15*), a member of the ubiquitin gene family, plays important roles in the innate immune response, regulation of interferon signaling, and pregnancy in human. In this study, the cDNA sequence of *LmISG15* was cloned and analyzed. The full length of *LmISG15* cDNA is 1625 bp, with an open reading frame (ORF) of 480 bp encoding 160-amino acid protein, a predicted molecular weight of 17.5 kD and a theoretical isoelectric point of 9.41. The amino acid sequence of *LmISG15* contains two UBL domains located at 1–76 and 85–155 respectively, and the C-terminal domain contains LRGG motif as the C-terminal of ubiquitin. The deduced amino acids sequence of *LmISG15* shared 74.07% and 71.88% identity with *ISG15* of *Sciaenops ocellatus* and *Oplegnathus fasciatus*, respectively. *LmISG15* was constitutively expressed in various tissues, with the highest expression level in heart, and then brain, kidney and gill, and the lowest level was detected in muscle of ISKNV-infected *L. maculatus*. After challenged with ISKNV, the transcript levels of *LmISG15* peaked in the head-spleen at 48 h, and in the liver and gill at 72 h. The expression of *LmISG15* in the three tissues gradually returned to normal at 5d after reaching the peak. The increased expression of *LmISG15* in various tissues of *L. maculatus* following ISKNV infection implies the potential involvement of *LmISG15* in the immune response of sea bass.

Key words: *Lateolabrax maculatus*; *ISG15*; clone and expression; ISKNV; IFN

Corresponding author: QIU Lihua. E-mail: qiugroup_bio@outlook.com